

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/02848 A1

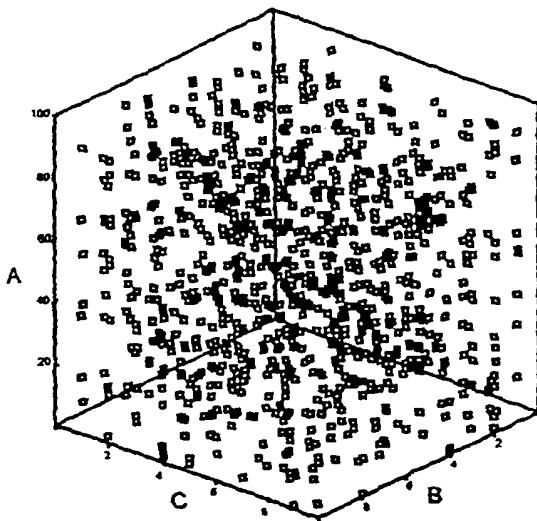
(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 30/46 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02154 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HORN, Anton [DE/DE]; Pennickental 4, D-07749 Jena (DE).
(22) Internationales Anmeldeatum: 4. Juli 2000 (04.07.2000) KREUSCH, Stefan [DE/DE]; Freiligrathstrasse 90, D-07743 Jena (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: JENOPIK AG; Gewerbliche Schutzrechte, D-07739 Jena (DE).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Angaben zur Priorität: 199 32 270.8 5. Juli 1999 (05.07.1999) DE
(71) Anmelder und
(72) Erfinder: MOORE, Thomas [DE/DE]; Zur Lämmerlaide 15, D-07751 Drackendorf (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE MULTI-DIMENSIONAL ANALYSIS OF A PROTEOME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MEHRDIMENSIONALEN ANALYSE EINES PROTEOMS



WO 01/02848 A1

(57) Abstract: The invention relates to a method for the multi-dimensional analysis of a proteome. The method is used in the biochemical, biotechnological and medical fields and in the pharmaceutical industry for diagnostic purposes and for developing biologically active substances. The aim of the invention is to improve, facilitate and for certain proteins first of all to enable the quantification and identification of the proteins of a proteome. According to the invention, the proteins of a proteome are subjected to a large number n of different separation processes under standardised conditions in such a way, that each respective liquid fraction m_1 , obtained in a separation stage, delivers m_2 liquid fractions in a separation stage which immediately follows. After n separation stages, $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$ liquid fractions have been produced which are identified qualitatively or quantitatively by known identification methods using o different analysis methods and which are quantitatively determined also by known quantification methods in such a way, that once the analysis data has been unified in a database, an n -dimensional image of the proteome is obtained which is characterised by identifiers and quantifiers and by the position in the n -dimensional network.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms. Das Verfahren findet in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der Medizin sowie in der Pharmazeutischen Industrie Verwendung und dient u.a. zu diagnostischen Zwecken und zur Entwicklung biologisch wirksamer Substanzen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die Quantifikation und Identifikation der Proteine eines Proteoms zu verbessern, zu erleichtern und für bestimmte Proteine überhaupt erst zu ermöglichen. Erfindungsgemäß werden die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl n verschiedener Trennverfahren derart unterworfen, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen flüssigen Fraktionen m_1 in einem darauf folgenden Trennschritt m_2 flüssige Fraktionen liefert, wobei nach n Trennschritten $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$ flüssige Fraktionen vorliegen, die mit o verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten in einer Datenbank ein n -dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im n -dimensionalen Netz, gewonnen wird.



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

— *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Beschreibung der Erfindung

Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms, bei dem das biologische Gewebe mit dem zu analysierenden Proteom aufgeschlossen und die zu dem Proteom gehörenden Proteine getrennt sowie quantitativ bestimmt und identifiziert werden. Das Verfahren findet in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der Medizin sowie in der Pharmazeutischen Industrie Verwendung und dient u. a. zu diagnostischen Zwecken und zur Entwicklung biologisch wirksamer Substanzen. Spezielle Einsatzgebiete eröffnen sich in der Grundlagenforschung, beispielsweise für die Klärung entwicklungsbiologischer oder zelldifferenzierender Fragestellungen, sowie in der angewandten Forschung für das Screening von Wirkstoffbanken, für die Entwicklung und Optimierung biologisch aktiver Substanzen oder für die Differenzierung zwischen normalen und pathogenen Zuständen in Organismen.

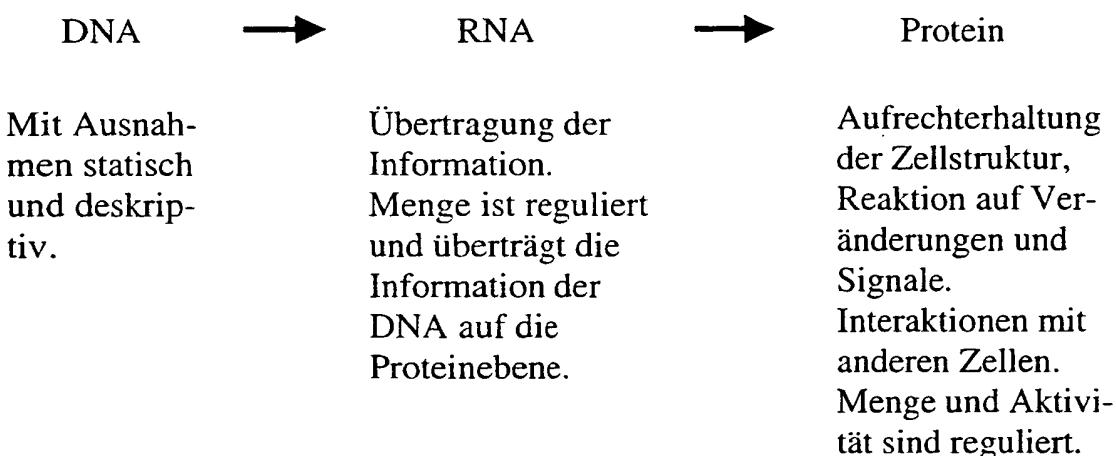
In der jüngeren Vergangenheit wurden Genome von Organismen ganz oder zu großen Teilen sequenziert [Fraser CM et al.: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science*, 1995, Oct 20, 270 (5235), 397-403; Fleischmann RD et al.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, Jul 28, 269 (5223), 496-512; Blattner FR et al.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 1997, Sep 5, 277 (5331), 1453-74; Goffeau A et al.: Life with 6000 genes, *Science*, 1996, Oct 25, 274 (5287), 546, 563-7]. Noch intensiver wurden cDNA-Abschnitte sequenziert [Clark MS: Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project, *Bioessays*, 1999, Feb,

21 (2), 121-30; Evans MJ et al.: Gene trapping and functional genomics, Trends Genet, 1997 Sep, 13 (9), 370-4]. Die Sequenzdaten sind in Datenbanken gespeichert. Die Aufklärung des Genoms eines Organismus führt letztlich "nur" zur Kenntnis des relativ statischen Informationsgehaltes des genetischen Materials für diesen Organismus. Mit den Sequenzen der cDNA- ist es prinzipiell möglich, Expressionslevel der mRNA auch zellspezifisch und umweltspezifisch zu ermitteln und damit ein Genexpressionsmuster der RNA zu erhalten.

Aus einem Gen des Genoms können

- a) durch verschiedene Prozesse, unterschiedliche mRNA-Sorten entstehen, die für divergente Proteine kodieren, und
- b) die aus ihnen entstehenden Proteine können durch posttranskriptionale Modifikation eine Vielzahl außerordentlich unterschiedlich funktionierender Proteine bilden. Zu den bisher bekannten Modifikationen gehören Phosphorylierung und Dephosphorylierung, limitierte Proteolyse, Acetylierung, Methylierung, Adenylierung, Sulfatierung, Glykosylierung [McDonald LJ et al.: Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine, Mol Cell Biochem, 1994 Sep, 138 (1-2), 221-6; Baenziger JU: Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it!, FASEB J, 1994 Oct, 8 (13), 1019-25; Mimnaugh EG et al.: The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins, Electrophoresis, 1999 Feb, 20 (2), 418-28; Davis PJ et al.: Protein modification by thermal processing, Allergy, 1998, 53 (46 Suppl), 102-5]. Die exprimierten und modifizierten Proteine ergeben aber letztendlich das Muster, welches die Zelldifferenzierung und die Reaktion auf innere und äußere Einflüsse von Zellen beschreibt. Am augenfälligsten ist die eingeschränkte Bedeutung der Kenntnis des Genoms für die Realisierung eines definierten biologischen Zustandes, wenn man die unterschiedlichen Zellen in verschiedenen Organen und innerhalb eines

Organs vergleicht. Beispielsweise haben eine Leberparanchymzelle, eine Nervenzelle des Gehirns und eine Mukosazelle des Darms den selben Satz genetischer Information, aber völlig unterschiedliche Funktion, die durch die Regulation der Expression des Genoms in diesen Zellen und die Regulation des Enzym- und Proteinmusters innerhalb der Zellen sowie der verschiedenen Gewebe hervorgerufen wird.



Die Begriffsbestimmung des "Proteoms", erfolgte erst 1996 [Friedrich GA: Moving beyond the genome projects, Nat Biotechnol, 1996 Oct, 14 (10), 1234-7].

Das Proteom, das heißt die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle mit einem bestimmten Entwicklungsstand und unter definierten Umweltbedingungen, stellt eine sehr viel dynamischere Repräsentation des physiologischen Zustandes von Zellen, Organen und Organismen dar. Die Proteomanalytik untersucht, welche Teile des Genoms unter definierten, zellspezifischen Bedingungen exprimiert und modifiziert werden. Dies führte zu schnell anwachsendem Interesse an diesem Gebiet, mit der Folge von ansteigenden Publikationszahlen (PubMed query Suchbegriff: Proteome; Suche 1 Jahr zurück: 64 Einträge, 2 Jahre zurück: 99 Einträge, 5 Jahre zurück: 122 Einträge), Kongressen und Veranstaltungen zu dieser Thematik.

Um ein quantifizierbares "Bild" eines Proteoms zu erhalten, wird gegenwärtig folgendermaßen verfahren: In einem ersten Schritt müssen die biologischen Materialien aufgeschlossen und homogenisiert werden (mit Ausnahmen: z. B. beim Serum liegen sie in einer homogenen Lösung vor). Im zweiten Schritt erfolgt die Trennung der Proteine, im dritten die Identifizierung und im vierten die Auswertung der erhaltenen Daten [Ben RH et al.: Two dimensional electrophoresis, The state of the art and future directions, Proteome Research, New frontiers in functionel genomics, Springer 1997 Chap, 2, 13-33].

1. Aufschluß

Hierfür werden bekannte Verfahren und Anordnungen aus der Biochemie eingesetzt, wie beispielsweise Scherkrafthomogenisatoren, Ultraschallbehandlung, Hochdruckpressen. Die Schwierigkeit besteht in einem quantitativen und möglichst die Funktion der Proteine nicht zerstörenden Aufschluß, denn nur quantitativ aufgeschlossene Proteine liefern in dem nachfolgenden zweiten Schritt (Trennung und Detektion der Proteine) ein reales Bild des Probenmaterials [Rabilloud T: Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis, An outline, Methods Mol Biol, 1999, 112, 9-19; Rabilloud T et al.: Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, Electrophoresis, 1997 Mar-Apr, 18 (3-4), 307-16; Staudenmann W et al.: Sample handling for proteome analysis, Electrophoresis, 1998 May, 19 (6), 901-8].

2. Trennung und Detektion

Für die Trennung der Proteine des Proteoms wird gegenwärtig essentiell die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Es sind erste Versuche mit einer zweidimensionalen HPLC unternommen worden. Diese haben jedoch bisher nicht die Trennschärfe der zweidimensionalen Elektrophorese erreicht

[Opiteck GJ, et al. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal Biochem*. 1998 May 1;258(2):349-61.]. Die erste Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese ist eine Trennung nach dem isoelektrischen Punkt, also letztendlich nach den Ladungseigenschaften eines Proteins. In der zweiten Dimension wird nach der Größe der Proteine in einem denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Gel getrennt. Diese Trenntechnik ist seit etwa seit 20 Jahren bekannt. Ein Vorteil der 2-D-Elektrophorese liegt in der Möglichkeit, eine relativ große Zahl von Proteinen auf einer Fläche mit hoher Auflösung zu trennen. Man geht gegenwärtig davon aus, daß ca. 10.000 Proteine in einem solchen zweidimensionalen Gel nachgewiesen werden können [Klose J et al.: Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 1995, Jun 16 (6), 1034-59]. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß man durch radioaktive Markierung oder nach der Anfärbung mit ebenfalls bekannten Techniken in der Lage ist, die getrennten Proteine zu quantifizieren. Diese Quantifizierungsmethoden sind proteinspezifisch, haben einen eingeschränkten dynamischen Nachweisbereich, sind in der Regel schwer automatisierbar und sind abhängig von den jeweiligen (oft nicht vollständig zu reproduzierenden) Einsatzbedingungen [James P: Of genomes and proteomes, *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, Feb 3, 231 (1), 1-6]. Sie sind nur für relative Bestimmungen geeignet. Die Quantifizierung über immunologische Eigenschaften ist problematisch, weil dafür Blottechniken mit eingeschränkter quantitativer Aussagekraft eingesetzt werden müssen.

Das Ergebnis ist ein fingerabdruckähnliches Bild, welches das Proteom charakterisiert.

Die Nachteile dieser Trenntechnik sind:

- eingeschränkter dynamischer Bereich, der durch die Belastbarkeit der Trenngele hervorgerufen wird
- die maximal einsetzbare Proteinmenge ist auf einen Bereich von μ g bis mg Protein begrenzt [James P: Of genomes and proteomes, Biochem Biophys Res Commun, 1997, Feb 3, 231 (1), 1-6]
- Einschränkung des verwendeten Probenvolumens
- die Trennung ist auf zwei Dimensionen beschränkt
- die für die Trennung benötigten Ampholyte und das Gelmaterial Acryllamid können zu Artefakten führen und dadurch zu schwer erkennbaren Fehlinterpretationen beitragen
- Proteine, die in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, ergeben relativ starke Signale und überdecken solche in niedrigen Konzentrationen vorhandene, so daß eine direkte Identifikation und Quantifizierung in diesem Falle nicht möglich ist
- der Verlust der nativen Konformation im denaturierenden Trenngel bedingt den Verlust der biologisch funktionellen Eigenschaften und erschwert die Identifikation der Proteine über die Bestimmung ihrer biologischen Eigenschaften, wie beispielsweise ihrer katalytischen Aktivität oder ihrer spezifischen Bindungseigenschaften
- die Sekundäranalyse, wie die häufig eingesetzte, spezifische Proteolyse einzelner Proteine, gefolgt von Massebestimmungen, macht einen schwer automatisierbaren Extraktionschritt aus dem Gel oder von der Blotmembran notwendig.

3. Identifikation der Proteine

Hierfür werden üblicherweise die Sequenzierung, die Massenanalyse und Schätzung des isoelektrischen Punkts aus der Laufstrecke im Gel sowie die Peptidfragmentmassenanalyse nach Isolierung aus dem Gel und tryptischem Verdau in der Massenspektrometrie eingesetzt [Shevchenko A et al.: Linking

genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, Proc Natl Acad Sci USA, 1996, Dec 10, 93 (25), 14440-5; Traini M et al.: Towards an automated approach for protein identification in proteome projects, Electrophoresis, 1998, Aug 19 (11), 1941-9]. Durch die verwendete Trenntechnik werden Merkmale, wie beispielsweise die katalytische Aktivität der Proteine und die native Konformation, nahezu vollständig ausgeschaltet und stehen nicht für die Identifikation zur Verfügung.

Die Vor- und Nachteile der bekannten Identifikationsverfahren sind insbesondere:

- Die Sequenzierung erfolgt durch Edman Abbau an automatisierten Einrichtungen und ist relativ kosten- und zeitaufwendig. Sie erfordert größere Mengen des Proteins. Deshalb ist sie trotz gegenwärtiger Weiterentwicklung für ein Massenscreening weniger geeignet [Gooley AA et al.: A role for Edman degradation in proteome studies, Electrophoresis, 1997, Jun 18(7), 1068-72]. Für die Identifizierung von primär unbekannten Proteinen ist dieser Analyseschritt allerdings in den meisten Fällen notwendig.
- Die Spezifität der Aussage der Massenbestimmung eines Proteins, die letztlich zu seiner Identifizierung führen soll, wird dadurch erhöht, daß man die Proteine nach der Trennung einem Proteaseverdau unterwirft, und die mittels Massenanalytik erhaltenen Informationen mit den aus der Primärstruktur vorhergesagten Massen der Peptidsequenzen nach dem tryptischen Verdau vergleicht. Im wesentlichen werden zwei Arten der Massenspektrometrie eingesetzt. Das sind erstens die Matrix assistierte Laserdesorptionsionisierungs - Massenspektrometrie (MALDI-MS) und zweitens die Electrospray Ionisierungs - Massenspektrometrie (ESI-MS) [Ducret A et al.: High throughput protein characterization by automated

reverse-phase chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, Protein Sci, 1998, Mar 7 (3), 706-19; Parker KC et al.: Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination, Electrophoresis, 1998, Aug 19 (11), 1920-32]. Die erste Methode hat den Vorteil, daß sie einen sehr großen Massebereich bis zu 1 Mio Dalton zu analysieren erlaubt und relativ robust durchführbar ist. Allerdings kann sie nur diskontinuierlich durchgeführt werden. Die ESI-Technik hingegen kann quasi kontinuierlich an Trenntechniken angeschlossen werden und zeigt gegenwärtig einen starken Zuwachs sowohl in der Entwicklung der Applikationsbreite als auch hinsichtlich der technologischen Möglichkeiten. Die enormen Fortschritte, die in den letzten Jahren mit beiden Techniken erreicht wurden, erlauben Massenauflösungen bis zur Isotopenverteilung, also Auflösungen kleiner 1 Dalton. Damit wird ein Massenspektrum von Peptidfragmenten nach sequenzspezifischen, definiertem Proteaseverdau oder einer anderen definierten Spaltung der Proteine erhalten. Dieses Spektrum ist typisch für jedes Protein und wird zur Proteinidentifizierung in Sequenzdatenbanken von Proteinen und Expressed Sequence Tag Banken eingesetzt. Da die Identifikation des Proteins durch die präzise Identifikation der vorhergesagten Peptide nach Proteaseverdau zustande kommt, stört jede posttranskriptionale Modifikation der Proteine, beispielsweise durch Glykosylierung, die Erkennung. Darüber hinaus können Fragmentierungsspektren der einzelnen Peptide im Massenspektrometer Informationen über die Aminosäuresequenz der Peptide liefern. Diese Sequenzinformation kann allein oder zusammen mit den anderen bekannten Daten des Proteins zu dessen Identifizierung in einer Sequenzdatenbank genutzt werden. Dieses Verfahren zur Sequenzanalyse ist gegenwärtig auf Grund der Schwierigkeiten einer korrekten Dateninterpretation noch nicht im

Routineeinsatz. Die Grenzen der Proteinidentifizierung durch massenspektrometrische Methoden bestehen in der nicht vollständigen Erfassung aller Proteinsequenzen in den vorhandenen Datenbanken.

4. Datenanalyse

Die erhaltenen Charakteristika der einzelnen detektierten Proteine aus der Trennung in der 2-D- Elektrophorese, wie die Quantität, isoelektrischer Punkt und Größe, die Daten zur Proteinidentifizierung aus weiteren Schritten, beispielsweise der Sequenzierung oder Massenspektrometrie, werden zusammengeführt. Hieraus ergibt sich das Bild der Gesamtheit der Proteine mit ihrer Identität und Quantität in dem jeweiligen Proteom.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die Quantifikation und Identifikation der Proteine eines Proteoms zu verbessern, zu erleichtern und für bestimmte Proteine überhaupt erst zu ermöglichen.

Erfnungsgemäß werden die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl n verschiedener Trennverfahren derart unterworfen, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen m_1 flüssigen Fraktionen in einem darauf folgenden Trennschritt m_2 flüssige Fraktionen liefert, wobei nach n Trennschritten $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$ flüssige Fraktionen vorliegen, die mit r verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten ein n -dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im n -dimensionalen Datenraum, gewonnen wird.

In den Unteransprüchen 2-12 sind vorteilhafte Ausführungsformen des Verfahrens aufgeführt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die enge Mengenlimitation durch die Belastbarkeit der bisher verwendeten 2-D-Elektrophorese nicht mehr gegeben. Es sind Proteinmengen im Bereich einiger Gramm einsetzbar. Die Trennmatrices sind mehrfach nutzbar. Hierdurch ist eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielbar. Das eingesetzte Probenmaterial liegt in der flüssigen Phase vor und ist somit anschließenden Analyseschritten unmittelbar zugänglich. Durch den besseren Erhalt der nativen Eigenschaften während der Trennung sind analytische Verfahren, wie die Aktivitätsbestimmung, und immunologische Verfahren, die auf der nativen Konformation des Analyten beruhen, möglich. Die Trennung von Analyten mit gleichen Ladungs- und Größeneigenschaften ist in der meist verwendeten 2-D-Elektrophorese nicht möglich. Durch den Einsatz von mindestens einem weiteren Charakteristikum, wie beispielsweise der Hydrophobizität des Analyten, zur Trennung entfällt allerdings diese Einschränkung.

Die Proben stehen in den Fraktionen nach der Trennung auch weiteren präparativen Arbeiten zur Verfügung.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

Es zeigen:

Fig. 1: Trennung von 1000 Proteinen in drei Dimensionen

Fig. 1a: Fraktionen 1 bis 33

Fig. 2a: Fraktionen 33/34 bis 67

Fig. 3a: Fraktionen 68 bis 100

Fig. 2: Graphische dreidimensionale Darstellung der Fraktionen gemäß

Fig. 1

Als Ausführungsbeispiel sollen 1000 Proteine durch drei Eigenschaften A, B, C beschrieben werden. Diese Eigenschaften können zum Beispiel Größe, Ladung und Hydrophobizität sein. Die Eigenschaften sind in den Proteinen zufällig verteilt. Alle Proteine sind fortlaufend numeriert. Hierauf erfolgt eine Trennung nach der Eigenschaft A (beispielsweise der Größe), bei der 100 Fraktionen a mit den entsprechenden Proteinen erhalten werden. Diese Fraktionen a werden nach der Eigenschaft B (beispielsweise der Ladung) in jeweils 10 Fraktionen b getrennt.

Jede dieser Fraktionen b wird einer Trennung nach der Eigenschaft C (beispielsweise der Hydrophobizität) unterworfen und liefert die Fraktionen c. Insgesamt werden $100 \times 10 \times 10 = 10.000$ einzelne Fraktionen erhalten. Jedes durch die Trennung erhaltene Protein wird nach seinen Eigenschaften eindeutig einer der Fraktionen a, b, c zugeordnet. In der Aufstellung gemäß Fig. 1 sind die jeweiligen Fraktionen durch Zahlen bezeichnet. Hierbei sind die Fraktionen a der Eigenschaft A zugehörig. Sie teilen den möglichen Wertebereich der Eigenschaft A in jeweils einhundert gleiche Teile, d. h. für die Voraussetzung eines Wertebereichs von 0 bis 100 entspricht beispielsweise der Wert 1 dem Bereich 0 bis 1, der Wert 2 dem Bereich 1 bis 2, ..., der Wert 100 dem Bereich 99-100. Analog sind die möglichen Wertebereiche der Eigenschaften B und C in jeweils zehn gleiche Teile eingeteilt, d. h. beispielsweise der Wert 1 entspricht dem Bereich 1-10. Durchschnittlich jede zehnte Fraktion enthält ein Protein.

Aus der Zufallsbetrachtung ergibt sich die Möglichkeit von Mehrfachbesetzungen. In dem in der Aufstellung nach Fig. 1a-c aufgeführten Beispiel sind 39 Doppelbelegungen und eine Dreifachbelegung von Fraktionen enthalten.

Aus Platzgründen und der Übersicht halber sind die leeren 9.000 Fraktionen nicht dargestellt.

Fig. 1 enthält folgende tabellarische Auflistung:

Protein Nr.	Fraktionen a	Fraktionen b	Fraktionen c
,			

wobei in Fig. 1a die Fraktionen $a = 1$ bis 33, in Fig. 2a die Fraktionen $a = 33/34$ bis 67 und in Fig. 1c die Fraktionen $a = 68$ bis 100 aufgeführt sind.

Fig. 2 zeigt ein dreidimensionales Diagramm mit den Positionen der durch Proteine besetzten Fraktionen nach Fig. 1.

Aufstellung der verwendeten Bezugszeichen

A, B, C - Eigenschaft von Proteinen

a, b, c - Fraktion

Patentansprüche

1. Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms, bei dem das biologische Material mit dem zu analysierenden Proteom aufgeschlossen und die zu dem Proteom gehörenden Proteine getrennt sowie quantitativ bestimmt und identifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl n verschiedener Trennverfahren für $n > 2$ derart unterworfen werden, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen flüssigen Fraktionen m_1 in einem darauf folgenden Trennschritt m_2 flüssige Fraktionen liefert, wobei nach n Trennschritten $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$ flüssige Fraktionen vorliegen, die mit r verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und/oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten ein n -dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im n -dimensionalen Datenraum, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Trennverfahren Methoden, die nach der Größe der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Masse der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Ladung der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Hydrophobizität der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Form der Proteine trennen und/oder Methoden, die nach der Affinität der Proteine hinsichtlich spezifischer Liganden auch zu Antikörpern trennen, ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Identifikationsverfahren Methoden zur Bestimmung spezifischer immunologischer Eigenschaften und/oder Bestimmungsmethoden spezifischer katalytischer Aktivität und/oder Bestimmungsmethoden zur chemischen Modifikation der Proteine des Proteoms eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Quantifikationsverfahren Methoden der unspezifischen Bestimmung der Protein-Konzentration mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten und/oder quantitative Bestimmungsmethoden zur Bestimmung spezifischer katalytischer Aktivitäten und/oder quantitative immunologische Methoden und/oder quantitative Bindungsassays ausgewählt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifikation einzelner Proteine des Proteoms direkt über die Massebestimmung der Proteine erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifikation einzelner Proteine des Proteoms nach Protease Verdau und Masseidentifikation der Fragmente erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim ersten Trennschritt die Fraktionen in einem zweidimensionalen Mehrfachgefäßsystem, vorzugsweise in der Art und mit der Grundfläche von Mikrotitrationsplatten gesammelt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim ersten Trennschritt die Fraktionen in einem definierten Raster, vorzugsweise im n * 96 - fach Raster der Mikrotiterplattentechnologie gesammelt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Identifikations- und Quantifikationsschritte in einem definiertem Raster, vorzugsweise dem $n * 96$ - fach Raster, mit paßfähiger Liquidhandlingstechnik erfolgen.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß alle Identifikations- und Quantifikationsschritte mit wenigstens vier zweidimensional angeordneten und simultan arbeitenden Pipettorkanälen erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Dimension zur Trennung ein an sich bekannte hochauflösende Größenausschluß-, eine Ionenaustausch oder eine Hydrophobizitätschromatographie ist, daß die zweite Dimension durch parallele Trennung und Fraktionierung der Fraktionen der ersten Dimension nach einem anderen als dem für die erste Dimension verwendeten Trennprinzip erfolgt und daß jede weitere Trennung und Fraktionierung durch parallele Trenn- und Fraktioniermethoden mit den aus den jeweils vorhergehenden Trenn- und Fraktionierschritten erhaltenen Fraktionen erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Analysedaten für das n-dimensionale Abbild des Proteoms in einer Datenbank zusammengefaßt werden.

1/4

Prot. Nr.	Fra .a	Fra k.b	Fra k.c	373	6	10	4	236	14	3	3	634	20	6	5	647	28	2	10
404	1	1	9	699	7	1	1	724	14	4	7	540	20	6	5	242	28	4	8
218	1	3	3	508	7	1	8	151	14	6	7	385	20	8	5	757	28	5	7
970	1	4	1	480	7	1	9	275	14	7	1	316	20	10	10	450	28	6	3
777	1	4	10	582	7	2	10	304	14	7	6	70	21	1	3	707	28	9	2
325	1	5	1	531	7	2	10	726	14	7	10	7470	21	2	5	6111	28	9	10
190	1	5	7	177	7	6	9	664	14	10	6	66	21	2	5	426	28	9	10
348	1	6	2	918	7	7	4	214	15	1	7	904	21	3	8	463	29	1	6
459	1	6	4	239	8	1	6	525	15	1	10	6955	21	3	8	259	29	2	4
156	1	8	6	649	8	1	9	263	15	2	4	795	21	4	4	19	29	4	3
172	1	8	7	106	8	2	1	181	15	2	10	23	21	6	5	4530	29	4	6
999	1	8	10	610	8	2	6	289	15	3	5	811	21	8	8	722	29	4	6
598	1	10	9	738	8	5	3	731	15	5	3	29	21	9	5	60	29	5	1
1891	1	10	9	161	8	5	8	547	15	6	3	362	21	10	3	603	29	5	2
281	2	1	1	154	8	7	5	877	15	6	10	709	22	1	6	907	29	6	5
618	2	2	10	981	8	8	5	631	15	7	6	347	22	2	8	660	29	7	4
274	2	4	10	972	9	3	5	596	15	7	7	695	22	3	1	685	29	8	7
849	2	5	2	96	9	3	7	202	15	7	10	663	22	4	4	411	29	10	4
494	2	6	2	192	9	4	4	535	15	9	5	597	22	4	7	829	29	10	5
81	2	7	3	694	9	6	2	193	15	9	5	579	23	2	6	797	30	3	3
564	2	10	2	691	9	6	2	800	16	1	7	614	23	2	10	383	30	3	6
670	2	10	4	952	9	6	8	187	16	1	8	434	23	3	9	600	30	3	8
562	3	1	8	68	9	8	1	560	16	3	3	22	23	8	3	472	30	4	9
805	3	2	3	913	9	8	9	98	16	5	4	420	23	8	5	32	30	5	2
108	3	2	9	950	9	9	5	714	16	6	1	983	23	10	5	542	30	6	3
923	3	3	3	150	9	10	6	680	16	7	3	975	23	10	6	953	30	6	6
386	3	3	5	137	10	1	9	652	16	8	7	244	24	1	1	391	30	8	9
295	3	4	5	80	10	2	1	454	16	8	8	688	24	2	2	171	30	10	4
36	3	7	1	969	10	4	1	390	16	8	8	561	24	3	9	123	30	10	8
20	3	10	4	778	10	5	3	876	16	9	5	257	24	4	4	224	31	1	2
606	3	10	5	462	10	7	8	369	16	9	8	5	24	5	5	418	31	2	6
592	4	1	3	737	10	8	8	116	16	10	2	280	24	6	8	964	31	2	10
8	4	2	6	785	10	9	9	770	17	2	4	212	24	8	7	773	31	3	7
917	4	2	8	802	10	10	3	902	17	3	6	896	25	2	2	762	31	4	4
756	4	3	8	856	11	1	1	988	17	3	7	389	25	2	5	159	31	5	3
255	4	4	8	467	11	6	8	957	17	4	4	815	25	3	8	73	31	5	8
483	4	4	9	932	11	9	4	183	17	4	10	331	25	4	5	409	31	7	9
503	4	6	2	927	11	10	1	946	17	5	6	589	25	6	8	783	31	8	7
991	4	6	9	326	11	10	8	402	17	5	6	814	25	6	9	370	31	9	5
741	4	9	8	594	11	10	9	823	17	5	7	816	25	7	2	874	31	10	4
507	4	10	7	523	12	2	7	593	17	9	1	67	25	7	4	733	32	1	10
69	5	1	4	119	12	3	5	977	18	3	8	845	25	7	10	100	32	2	4
584	5	2	4	297	12	4	5	221	18	6	2	890	25	9	5	502	32	2	9
26	5	2	10	447	12	4	7	498	18	6	4	104	25	9	8	381	32	3	1
771	5	3	4	238	12	8	3	752	18	6	5	491	25	10	4	786	32	3	10
515	5	3	10	605	12	8	5	727	18	6	5	568	26	1	8	638	32	4	5
188	5	5	6	558	12	8	8	996	18	8	3	379	26	2	6	859	32	4	6
566	5	6	5	169	12	5	7	438	18	8	7	909	26	3	8	599	32	5	8
478	5	7	9	443	12	9	7	521	18	9	9	687	26	4	8	448	32	7	3
529	5	8	3	987	12	10	3	968	18	10	2	105	26	5	1	323	32	7	3
149	5	8	3	191	12	10	9	735	18	10	10	858	26	6	5	871	32	7	7
627	5	8	7	866	13	1	6	90	19	1	4	827	26	6	8	118	32	9	6
729	5	9	4	997	13	2	6	443	19	1	7	798	26	7	10	622	32	9	10
956	5	9	8	852	13	2	9	361	19	2	10	769	27	1	5	607	32	10	7
832	5	10	4	142	13	3	5	3	19	3	8	767	27	3	1	84	33	1	3
897	5	10	5	613	13	4	6	436	19	3	10	415	27	3	6	83	33	3	1
792	5	10	10	338	13	5	4	662	19	6	4	296	27	3	10	939	33	3	2
350	6	1	6	690	13	5	6	79	19	8	3	921	27	4	1	925	33	4	7
360	6	3	2	398	13	5	6	273	19	9	6	99	27	4	6	16	33	5	3
423	6	3	9	669	13	6	1	403	19	9	8	851	27	4	8	653	33	5	4
875	6	4	1	903	13	7	1	493	19	10	1	240	27	5	9	208	33	6	3
82	6	5	2	656	13	7	8	524	19	10	2	519	27	8	2	567	33	7	2
578	6	5	8	537	13	8	10	914	19	10	4	766	27	8	5	194	33	8	1
487	6	7	6	779	13	9	8	246	20	1	1	51	27	8	7	58	33	8	2
363	6	8	1	708	14	1	6	272	20	3	1	451	27	8	9	499	33	20	10
333	6	9	9	141	14	2	8	985	20	6	2	288	27	9	6	198	33	8	10

Fig. 1a

2/4

869	33	10	3	979	41	3	5	938	48	5	10	743	55	5	7	834	62	4	2
526	34	3	3	556	41	4	9	511	48	6	4	305	55	6	8	471	62	4	3
332	34	3	4	44	41	5	3	485	48	6	4	473	55	8	1	919	62	4	10
636	34	4	6	812	41	7	8	915	48	7	5	266	55	8	4	342	62	7	3
121	34	4	8	37	41	9	6	458	48	7	8	393	55	8	10	460	62	7	8
998	34	5	1	343	41	10	8	138	48	7	8	320	55	9	1	378	62	7	10
355	34	5	8	911	42	1	6	120	48	7	10	276	55	9	6	94	62	10	7
346	34	5	10	522	42	1	10	868	48	8	3	799	55	10	9	935	63	1	7
270	34	6	1	505	42	3	1	486	48	10	10	518	56	1	10	395	63	2	4
810	34	6	2	417	42	3	2	30	49	1	6	245	56	2	6	464	63	2	8
34	34	6	9	782	42	4	3	571	49	2	1	870	56	4	5	949	63	3	2
734	34	7	1	807	42	5	7	936	49	3	10	940	56	5	3	394	63	4	1
862	34	7	6	765	42	6	3	520	49	6	10	673	56	5	6	14	63	4	6
164	34	9	4	168	42	8	1	775	49	8	4	182	56	5	10	683	63	6	4
157	34	10	8	857	42	8	9	421	49	8	6	167	56	5	10	298	63	6	10
796	35	1	6	657	42	9	1	287	50	1	1	679	56	8	1	698	63	7	5
962	35	1	8	252	42	10	1	89	50	3	3	78	56	8	4	920	63	7	9
736	35	3	4	475	42	10	3	847	50	3	7	437	56	8	8	481	63	7	9
85	35	3	8	173	42	10	4	49	50	5	8	873	56	9	6	817	63	8	8
47	35	4	2	302	43	2	3	577	50	6	7	888	56	10	5	76	63	8	9
793	35	4	6	809	43	2	10	2	50	7	5	201	57	1	7	416	63	8	10
819	35	6	6	431	43	4	3	374	50	7	7	412	57	5	7	371	63	9	3
671	35	6	8	906	43	5	10	711	50	8	9	739	63	9	5	646	63	9	6
432	35	6	10	602	43	7	6	722	50	9	1	133	57	5	9	135	63	9	7
195	35	9	1	283	43	7	6	958	50	10	4	908	57	6	2	233	63	9	10
324	35	9	4	492	43	9	4	645	51	1	6	967	57	6	3	237	64	1	4
658	35	10	3	349	43	9	7	720	51	2	1	12	57	7	7	764	64	4	3
468	36	2	1	364	43	10	7	300	51	2	3	677	58	1	5	974	64	5	6
643	36	4	2	197	43	10	9	973	51	6	4	139	58	1	5	62	64	5	6
926	36	5	8	465	44	2	1	282	51	6	10	352	58	1	9	745	64	6	5
693	36	8	7	549	44	2	4	674	51	7	7	293	58	2	10	248	64	6	6
767	36	9	3	635	44	3	9	213	51	9	4	543	58	9	3	585	64	6	9
354	36	10	7	538	44	5	6	833	51	9	10	954	58	10	2	466	64	9	2
955	37	1	1	801	44	6	6	216	51	10	4	681	59	2	1	217	64	9	5
314	37	4	4	993	44	6	7	986	52	1	3	844	59	2	9	730	64	9	8
548	37	5	8	965	44	7	6	253	52	2	8	753	59	3	2	761	64	10	6
313	37	6	10	780	44	8	2	625	52	2	9	881	59	5	2	569	64	10	8
219	37	7	4	830	44	9	2	768	52	3	6	52	59	5	3	750	65	1	3
959	37	8	5	277	44	9	5	818	52	3	7	501	59	5	8	38	65	2	4
46	37	9	2	269	44	9	7	804	52	6	1	516	59	6	3	102	65	3	8
497	38	1	2	113	45	1	1	824	52	6	5	196	59	6	7	880	65	4	8
678	38	3	5	265	45	1	3	705	52	6	7	860	59	7	7	628	59	8	10
260	38	3	8	710	45	1	6	512	52	6	7	628	59	8	10	162	59	10	1
754	38	3	9	477	45	2	1	337	52	8	3	54	59	10	8	725	65	7	10
648	38	4	7	922	45	2	6	639	52	9	7	291	60	2	5	787	65	8	1
310	38	6	4	668	45	4	2	204	52	9	10	553	60	2	7	533	65	9	1
1209	38	6	4	271	45	4	7	284	52	10	7	655	60	2	9	408	65	9	8
990	38	6	7	863	45	6	2	615	53	1	3	227	60	5	4	882	66	1	2
11	38	8	10	39	45	7	5	261	53	1	8	612	60	5	4	264	66	1	5
941	38	9	5	948	45	7	9	604	53	10	3	165	60	8	1	87	66	1	6
184	38	9	8	376	46	1	5	15	53	10	7	199	60	8	2	429	66	2	5
637	39	1	8	428	46	5	5	441	53	10	8	210	60	10	2	867	66	3	6
545	39	2	7	317	46	8	1	843	54	1	3	442	60	10	6	539	66	3	5
163	39	7	9	117	46	9	6	97	54	1	6	728	60	10	9	789	66	3	8
267	39	8	8	689	47	1	5	235	54	4	1	633	61	1	1	328	66	4	9
1	39	9	6	992	47	2	4	212	54	6	10	570	61	1	4	960	66	6	3
229	39	10	1	559	47	2	6	583	54	6	10	220	61	1	6	640	66	8	8
53	39	10	4	375	47	3	10	91	54	7	3	179	61	5	5	794	66	9	1
822	40	1	3	554	47	5	4	249	54	7	4	808	61	7	8	452	67	1	5
891	40	1	7	624	47	6	6	24	54	8	2	223	61	9	2	500	67	1	8
335	40	3	6	565	47	6	5	576	54	8	10	336	62	1	10	510	67	3	6
623	40	4	2	457	47	9	3	160	55	1	10	232	62	2	6	10	67	5	2
901	40	5	8	17	47	10	4	410	55	2	1	77	62	2	8	650	67	6	3
828	40	6	6	864	48	1	1	929	55	2	4	399	62	2	10	490	67	6	9
666	40	7	10	372	48	2	4	387	55	2	5	55	62	3	8	586	67	7	9
474	40	10	2	759	48	2	7	74	55	2	9	675	62	3	10	344	67	8	4
704	40	10	3	129	48	3	4					482	67	8	7				

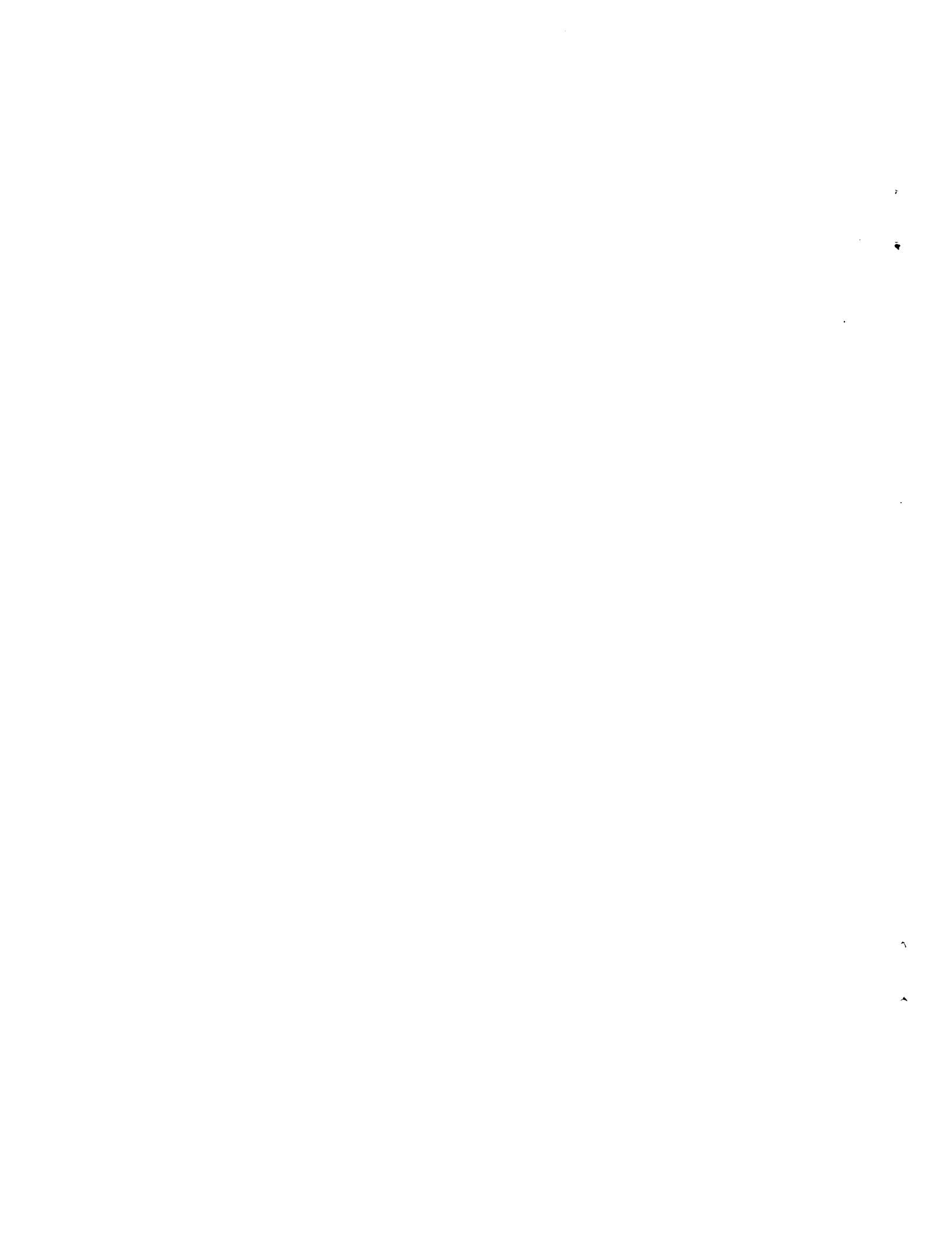
Fig. 1b



3/4

651	68	1	4	887	74	5	8	900	82	6	8	588	89	6	5	574	95	3	5
368	68	3	8	461	74	6	7	413	82	6	10	228	89	6	6	27	95	6	6
703	68	4	5	546	74	6	8	110	82	8	5	838	89	7	5	717	95	6	7
226	68	4	5	575	74	7	9	551	83	1	2	456	89	8	2	71	95	9	2
533	68	4	5	45	74	7	10	439	83	1	9	435	89	8	7	995	95	9	3
706	68	7	5	290	75	1	4	445	83	3	1	479	89	10	5	744	95	9	4
158	68	7	8	846	75	2	1	353	83	3	2	980	90	1	2	924	95	9	8
178	68	9	3	440	75	6	7	294	83	3	3	424	90	1	3	563	96	1	5
788	68	9	10	155	75	7	10	883	83	3	10	837	90	4	5	895	96	4	7
145	69	1	4	31	75	8	5	580	83	7	2	143	90	4	10	50	96	5	7
250	69	3	10	9	75	9	8	715	83	8	3	57	90	5	2	813	96	5	9
131	69	5	6	127	75	10	4	4	83	8	4	144	90	6	6	916	96	7	3
425	69	6	8	748	76	1	8	931	83	8	6	430	90	7	7	893	96	7	4
854	69	8	3	405	76	2	9	590	83	10	5	319	90	8	2	686	96	7	8
303	69	8	5	555	76	3	6	323	83	10	8	400	90	8	4	365	96	7	10
899	69	9	9	180	76	5	8	63	84	5	2	951	90	8	7	231	96	8	5
186	69	10	1	630	76	10	3	989	84	6	5	719	90	9	10	21	96	9	4
721	69	10	4	312	76	10	7	152	84	8	9	345	90	10	3	713	96	9	6
455	70	1	2	718	77	1	9	207	84	9	2	366	90	10	8	367	96	10	4
125	70	1	7	889	77	2	8	806	84	10	2	749	90	10	10	351	97	2	9
122	70	2	6	772	77	3	5	111	84	10	7	339	91	1	3	774	97	3	4
256	70	4	1	444	77	3	5	513	85	1	2	55	91	1	3	476	97	5	1
928	70	4	2	380	77	4	9	527	85	1	10	831	91	2	2	422	97	5	10
842	70	4	4	64	77	5	10	109	85	2	7	278	91	2	7	382	97	7	1
484	70	4	5	982	77	8	5	95	85	3	8	136	91	2	10	124	97	8	2
308	70	4	8	825	77	10	3	315	85	3	9	453	91	3	2	961	97	8	5
222	70	5	8	840	78	2	1	130	85	4	6	407	91	8	3	697	97	9	5
641	70	6	3	306	78	2	5	241	85	5	5	682	91	8	4	225	97	10	3
740	70	6	4	865	78	6	4	601	85	7	3	886	91	8	7	112	97	10	5
56	70	7	3	170	78	7	3	504	85	8	4	781	91	9	5	760	98	2	1
620	70	7	9	839	78	8	7	944	85	10	9	672	91	10	4	536	98	2	8
101	70	8	2	59	79	1	3	755	86	1	1	384	92	1	2	488	98	3	7
86	70	8	2	644	79	4	4	534	86	1	5	855	92	2	5	692	98	5	1
848	70	8	8	307	79	4	9	147	86	3	2	75	92	4	3	401	98	5	2
595	70	9	2	327	79	5	5	146	86	3	2	285	92	4	10	591	98	5	4
898	70	9	9	251	79	5	6	751	86	3	5	166	92	5	1	153	98	5	10
716	70	9	10	544	79	6	2	667	86	3	8	356	92	5	9	292	98	7	1
329	70	10	9	230	79	6	4	48	86	5	2	6	92	6	2	286	98	7	2
885	71	2	8	341	79	7	7	258	86	5	6	299	92	6	6	396	98	7	4
18	71	2	9	763	79	8	2	107	86	6	8	185	92	6	9	509	98	8	8
676	71	3	3	132	79	9	1	358	86	8	2	758	92	7	4	397	98	9	6
702	71	3	8	629	79	9	6	820	86	8	4	495	92	10	2	557	98	10	4
128	71	7	4	406	80	1	2	254	86	9	1	912	92	10	6	978	99	1	3
140	71	7	6	850	80	3	1	971	86	9	4	359	93	2	6	803	99	4	7
13	71	8	2	35	80	3	3	496	86	9	8	747	93	2	9	892	99	4	8
621	71	8	3	279	80	5	5	701	86	10	7	40	93	5	2	746	99	5	7
642	71	8	5	884	80	5	8	659	87	1	5	301	93	5	3	215	99	7	1
334	71	9	4	572	80	5	10	943	87	1	8	433	93	5	7	28	99	7	4
489	71	10	2	947	80	6	3	894	87	2	5	861	93	6	6	930	99	8	5
742	72	3	1	427	80	10	9	517	87	3	3	234	93	7	1	340	99	9	4
632	72	3	4	446	81	1	3	176	87	5	5	541	93	8	1	835	99	10	9
247	72	3	8	616	81	1	7	322	87	5	10	200	93	10	1	426	99	10	9
506	72	4	3	175	81	2	2	878	87	6	4	587	93	10	8	341	100	12	6
732	72	4	9	654	81	2	4	243	87	7	8	619	94	1	5	268	100	12	6
853	72	8	3	205	81	4	8	821	87	7	9	449	94	1	5	211	100	2	10
392	72	9	3	206	81	4	10	836	87	8	2	134	94	1	9	910	100	4	2
92	72	9	5	872	81	7	2	942	87	9	6	357	94	1	10	309	100	4	6
552	73	2	3	93	81	7	6	174	87	10	2	933	94	2	2	419	100	5	2
723	73	4	3	791	81	8	4	937	88	1	3	617	94	2	3	784	100	8	1
994	73	4	4	469	81	8	5	626	88	5	1	963	94	2	10	42	100	8	6
945	73	6	8	262	82	2	7	684	88	6	8	103	94	3	4	115	100	8	8
665	73	6	8	514	82	3	1	609	88	7	2	41	94	3	7	966	100	9	8
414	73	7	8	776	82	3	8	826	88	9	5	25	94	8	3	573	100	9	9
879	73	10	2	377	82	3	10	88	89	2	1	608	94	9	4	532	100	10	5
661	74	2	2	203	82	4	7	330	89	3	5	2934	95	1	7				
984	74	3	2	148	82	5	10	790	89	4	1	318	95	1	7				
905	74	5	1	1000	82	6	5	388	89	4	8	550	95	2	4				

Fig. 1c



4/4

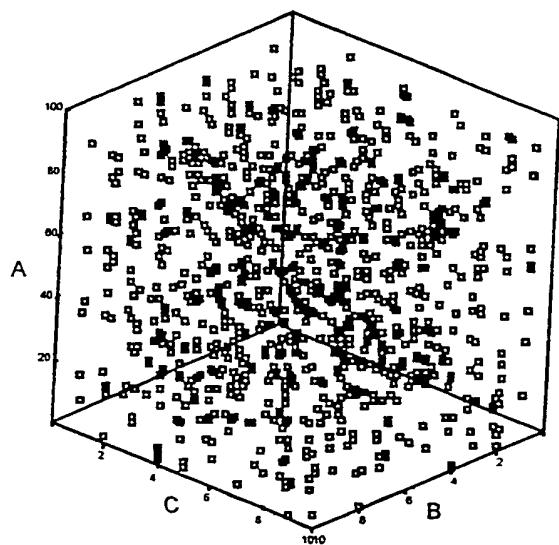


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/DE 00/02154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N30/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOORE A W ET AL: "COMPREHENSIVE THREE-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY/REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, vol. 67, no. 19, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 3456-3463, XP000535656 ISSN: 0003-2700 abstract; figures 1,4</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1, 2, 11, 12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

08/12/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern.	Application No
PCT/DE 00/02154	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OPITECK G J ET AL: "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ISOLATION OF OVEREXPRESSED PROTEINS AND PROTEOME MAPPING" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 258, no. 2, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 349-361, XP000960771 ISSN: 0003-2697 cited in the application abstract page 351 -page 352</p> <p>---</p>	1
A	<p>DUCRET A ET AL: "HIGH THROUGHPUT PROTEIN CHARACTERIZATION BY AUTOMATED REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 7, no. 1, 7 March 1998 (1998-03-07), pages 706-719, XP000965234 ISSN: 0961-8368 cited in the application abstract; figure 1</p> <p>---</p>	1
A	<p>BLACKSTOCK W P ET AL: "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 17, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 121-127, XP004157732 ISSN: 0167-7799 page 122 -page 124</p> <p>---</p>	1
A	<p>LOPEZ M F: "Proteome analysis - I. Gene products are where the biological action is" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, vol. 722, no. 1-2, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 191-202, XP004156213 ISSN: 0378-4347 page 198</p> <p>---</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/02154

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N30/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MOORE A W ET AL: "COMPREHENSIVE THREE-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY/REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, Bd. 67, Nr. 19, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 3456-3463, XP000535656 ISSN: 0003-2700 Zusammenfassung; Abbildungen 1,4</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1,2,11, 12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussistung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/DE 00/02154

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OPITECK G J ET AL: "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ISOLATION OF OVEREXPRESSED PROTEINS AND PROTEOME MAPPING" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 258, Nr. 2, 1. Mai 1998 (1998-05-01), Seiten 349-361, XP000960771 ISSN: 0003-2697 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 351 -Seite 352 ---	1
A	DUCRET A ET AL: "HIGH THROUGHPUT PROTEIN CHARACTERIZATION BY AUTOMATED REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 7, Nr. 1, 7. März 1998 (1998-03-07), Seiten 706-719, XP000965234 ISSN: 0961-8368 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1
A	BLACKSTOCK W P ET AL: "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 17, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seiten 121-127, XP004157732 ISSN: 0167-7799 Seite 122 -Seite 124 ---	1
A	LOPEZ M F: "Proteome analysis - I. Gene products are where the biological action is" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, Bd. 722, Nr. 1-2, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 191-202, XP004156213 ISSN: 0378-4347 Seite 198 ---	1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Patentanwälte	
OEHMKE & KOLLEGEN	
DRK:	PE-Nr.:
Neugasse 13	
07743 Jena	
ALLEMAGNE	
02-04-01	1037
B	F
O	X
<i>[Signature]</i>	

Date of mailing (day/month/year)
26 March 2001 (26.03.01)

Applicant's or agent's file reference
S1322

IMPORTANT INFORMATION

International application No. PCT/DE00/02154	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)
---	---	---

Applicant
MOORE, Thomas et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National :AU,BG,CA,CN,CZ,DE,IL,JP,KP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,CH,CR,CU,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,
GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,MX,PT,SD,
SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until **31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Sean Taylor

Telephone No. (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference S1322	FOR FURTHER ACTION SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/02154	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 30/46	RECEIVED JUN 21 2002 Technology Center 2000	
Applicant MOORE, Thomas		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 February 2001 (05.02.01)	Date of completion of this report 22 August 2001 (22.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-12, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages 1-12, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages 1/4-4/4, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/02154

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	7, 8, 10, 12	YES
	Claims	1-6, 9, 11	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents (**D1-D2**) cited in the international search report:

D1: ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1 May 1998, Vol. 258, No. 2, pages 349-361, ISSN: 0003-2697;

OPITECK G J et al: 'Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping'

(cited by the applicant)

D2: ANALYTICAL CHEMISTRY, 1 October 1995, Vol. 67, No. 19, pages 3456-3463, ISSN: 0003-2700;

MOORE A W et al: 'Comprehensive three-dimensional separation of peptides using size exclusion/reversed phase liquid chromatography/optically gated capillary zone electrophoresis'

2. D1 discloses a method for multidimensional analysis of a proteome according to the preamble of main



Claim 1 (cf. D1, page 353, left-hand column, second paragraph 'Each comprehensive searching program (66)'; figures). According to this known method, the proteins belonging to the proteome are first separated according to their size using the SEC method. In a second step, the protein fractions obtained thereby are concentrated on an RP-HPLC column and separated¹ from the elution liquid used for the SEC method. In the following step, the concentrated protein fractions are separated according to their hydrophobicity using a gradient elution.

- 2.1 Therefore '...the proteome proteins are subjected, under standardized conditions, to a multiple number n of different separating methods for $n > 2...$ ' such that 'each of the liquid fractions m_1 obtained in a separation step produces liquid fractions in a subsequent separation step m_2 , liquid fractions² being present after n separation steps $m_1^*m_2^*\dots m_n = M'$.
- 2.2 Furthermore, the liquid fractions resulting therefrom are quantitatively measured using UV-spectroscopy and the proteins obtained thereby are identified by means of MALDO-TOF/MS, ESI/MS or sequencing according to the Edman method, such that '...after combining the analytical data, an n -dimensional image of the proteome is obtained, characterized by identifiers and quantifiers and by the position in the n -dimensional data space'.

¹ which is surely equivalent to a second separation process!

² The case $m_2=1$ also comes under the valid wording of the claim!

2.3 It follows therefrom that the subject of the main claim lacks novelty over this prior art. Therefore the main claim does not meet the requirements of **PCT Article 33(2)**.

3. In addition, the subject of the main claim does not involve an inventive step pursuant to **PCT Article 33(3)**:

3.1 The method developed by the applicant differs from the prior art known from **D1** essentially in that the proteins are separated at least after a third characteristic, meaning in a third dimension. By implementing this measure, the problem of insufficient peak capacity, which was already recognized in **D1**, is accounted for. In this manner, the problem to be addressed by the application is solved, namely that of "improving, making easier, and for certain proteins, making at all possible the quantification and identification of the proteins of a proteome" (cf. present application, page 9, paragraph 3).

3.2 However, in the field of chromatography, it is quite commonplace to attempt to improve the peak capacity by introducing further separation dimensions. In particular, exactly this measure is taken in the device known from **D2** for separating peptides, in order to increase the peak capacity of the device (cf. D2, 'Conclusions'; figures). In addition, the separating methods of the first and second dimension in **D1** and **D2** are the same. For this reason, it would immediately occur to a person skilled in the art to apply the third separation method from **D2** to the method known from **D1**, in order to solve the problem



in question. In this way, he would arrive at the subject matter for which the applicant seeks protection, without thereby being inventive.

- 3.3 Therefore the main claim does not meet the requirements of **PCT Article 33(3)**.
4. Further, the additional features of Claims 2-12, which are dependent on the main claim, do not form a basis for novel and inventive subject matter, because they already belong to the prior art or are regarded as standard alternatives to the measures taken therein:
 - 4.1 For example, the separation methods used in **D1** and **D2** can be classified as coming under the methods indicated in Claim 2. Separation according to protein charge, shape, or affinity are further separation methods that are commonly used in this technical field. Similarly, the sequencing used in D1 according to the Edman method is an example of the identification method claimed in Claim 3. The determination of the protein concentration by means of UV-spectroscopy is known from D1 (cf. Claim 4). The identification of individual proteins of the proteome occurs in **D1** directly by means of the mass determination of the proteins (cf. Claim 5). The additional features of Claim 6 can likewise be found in D1. The same applies to the use of two-dimensional multiple vessel systems, in particular microtitration plates, for collecting the liquid fractions (cf. Claim 7 or 8). It would be obvious to also use a fraction collector after the first separation process, if the intermediate fractions were accessible. The additional features of Claim 9

were already disclosed in D1. Claim 10 pertains to standard technical measures for carrying out the method indicated in Claim 9. The method known from D1 comes under the scope of Claim 11. It would be obvious to combine the analytical data in a database.

4.2 Consequently, taking these measures does not involve an inventive step.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The scope of protection of the main claim includes any and all methods for multidimensional analysis of a proteome where $n > 2$. However, the description illustrates only one single embodiment, namely that of the case in which $n = 3$. There is nothing which indicates how the teaching of the invention is to be realized over the entire scope of protection. Consequently, the main claim is not supported in its full scope by the description. Therefore the main claim fails to meet the requirements of **PCT Article 6**.



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year)
26 March 2001 (26.03.01)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.
PCT/DE00/02154

Applicant's or agent's file reference
S1322

International filing date (day/month/year)
04 July 2000 (04.07.00)

Priority date (day/month/year)
05 July 1999 (05.07.99)

Applicant

MOORE, Thomas et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
05 February 2001 (05.02.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OEHMKE & KOLLEGEN
Neugasse 13
07743 Jena
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01)	
Applicant's or agent's file reference S1322	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE00/02154	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address JENOPTIK AG Gewerbliche Schutzrechte D-07739 Jena	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

Please note the new correspondence address as mentioned in the addressee's box.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sean Taylor
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
 Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

JENOPTIK AG
 Gewerbliche Schutzrechte
 D-07739 Jena
 ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 24 October 2000 (24.10.00)	
Applicant's or agent's file reference S1322	
International application No. PCT/DE00/02154	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)
Applicant MOORE, Thomas et al	

IMPORTANT NOTIFICATION

The applicant is hereby **notified** of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: 06 September 2000 (06.09.00), the following priority claim has been corrected to read as follows:

DE 05 July 1999 (05.07.99) 199 32 270.8

even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

2. **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:

even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

3. As a **result of the correction and/or addition** of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:

4. **Priority claim considered not to have been made.**

The applicant failed to respond to the Invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
 The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
 The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.

The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(1B).

5. In case where **multiple priorities** have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):

6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and

to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).
 the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kari Huynh-Khuong Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts S1322	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02154	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 04/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 05/07/1999
Anmelder MOORE, Thomas et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

VERFAHREN ZUR MEHRDIMENSIONALEN ANALYSE EINES PROTEOMS

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2

wie vom Anmelder vorgeschlagen

keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/D/0/02154

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N30/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MOORE A W ET AL: "COMPREHENSIVE THREE-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY/REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, Bd. 67, Nr. 19, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 3456-3463, XP000535656 ISSN: 0003-2700 Zusammenfassung; Abbildungen 1,4</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,11, 12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Dezember 2000	08/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OPITECK G J ET AL: "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ISOLATION OF OVEREXPRESSED PROTEINS AND PROTEOME MAPPING" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 258, Nr. 2, 1. Mai 1998 (1998-05-01), Seiten 349-361, XP000960771 ISSN: 0003-2697 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 351 -Seite 352 ----	1
A	DUCRET A ET AL: "HIGH THROUGHPUT PROTEIN CHARACTERIZATION BY AUTOMATED REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 7, Nr. 1, 7. März 1998 (1998-03-07), Seiten 706-719, XP000965234 ISSN: 0961-8368 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1 ----	1
A	BLACKSTOCK W P ET AL: "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 17, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seiten 121-127, XP004157732 ISSN: 0167-7799 Seite 122 -Seite 124 ----	1
A	LOPEZ M F: "Proteome analysis - I. Gene products are where the biological action is" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, Bd. 722, Nr. 1-2, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 191-202, XP004156213 ISSN: 0378-4347 Seite 198 -----	1

21

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) S1322

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

MOORE, Thomas
Zur Lämmerlaide 15
D-07751 Drackendorf
Deutschland

Telefonnr.:
03641 65 1421

Telefaxnr.:
03641 65 1429

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat)

DE

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

HORN, Anton
Pennickental 4
D-07749 Jena
Deutschland

nur Anmelder

Anmelder und Erfinder

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat)

DE

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als Anwalt gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Telefonnr.:

03641 65 3068

JENOPIK AG
Gewerbliche Schutzrechte
D-07739 Jena
Deutschland

Telefaxnr.:

03641 65 3681

Fernschreibnr.:

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KREUSCH, Stefan
Freiligrathstraße 90
D-07743 Jena
Deutschland

Diese Person ist:

nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist

EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist

EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist

OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

<input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien	<input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen
<input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australien	<input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan	<input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien	<input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi
<input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko
<input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> NZ Nenzeland
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> PL Polen
<input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik	<input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien
<input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation
<input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	<input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estland	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei
<input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana	<input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien	<input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania
<input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika
<input checked="" type="checkbox"/> IN Indien	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> IS Island	<input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia	<input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe
<input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea	Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITYANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Angedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 1999 05/07/2000	199 32 270.8			
Zeile (2)				
Zeile (3)				

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln, falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)
* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden): ISA /	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)		
--	--	--	--

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 4	1. <input type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 13	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 3	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 4	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : _____	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 25	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
	8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzelnen aufführen):

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

2

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingebracht wird:

deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Thomas Moore

 26.07.2000

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind):	ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:



16

VERTRAG ÜBER D[REI] INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 24 AUG 2001
WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts S006-S1322-WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02154	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 04/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 05/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N30/46		
Annehmer MOORE, Thomas et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I Grundlage des Berichts
II Priorität
III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI Bestimmte angeführte Unterlagen
VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.08.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Johnson, K Tel. Nr. +49 89 2399 2240



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02154

I. Grundlage des Be richts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*):

1-12 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-12 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02154

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 7 8 10 12
	Nein: Ansprüche 1-6 9 11
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-12
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-12
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Abschnitt V. Begründte Feststellung nach Artikel 35(2) PCT

1. In diesem Bericht wird Bezug auf die folgenden im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente (**D1-D2**) genommen:

D1 = ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1. Mai 1998, Bd. 258, Nr. 2, Seiten 349-361, ISSN: 0003-2697;

OPITECK G J et al: 'Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping'
(vom Anmelder zitiert)

D2 = ANALYTICAL CHEMISTRY, 1. Oktober 1995, Bd. 67, Nr. 19,

Seiten 3456-3463, ISSN: 0003-2700;

MOORE A W et al: 'Comprehensive three-dimensional separation of peptides using size exclusion/reversed phase liquid chromatography/optically gated capillary zone electrophoresis'

2. Das Dokument **D1** offenbart ein Verfahren zur multidimensionalen Analyse eines Proteoms gemäß dem Oberbegriff des Hauptanspruchs 1 (vgl. D1, Seite 353, linke Spalte, Absatz 2 'Each comprehensive two-dimensional analysis...' - Seite 359, rechte Spalte, Absatz 1 '...database searching program (66)'; Abbildungen). Nach diesem bekannten Verfahren werden die zu dem Proteom gehörenden Proteine zunächst nach ihrer Größe unter Verwendung des SEC-Verfahrens getrennt. In einem zweiten Schritt werden die dadurch entstehenden Proteinfaktionen auf einer RP-HPLC Säule konzentriert und von der für das SEC-Verfahren verwendeten Elutionsflüssigkeit getrennt¹. In dem darauf folgenden Schritt, werden die konzentrierten Proteinfaktionen nach ihrer Hydrophobizität unter Verwendung einer Gradientelution getrennt.
- 2.1 Also werden '...die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl n verschiedener Trennverfahren für n > 2 derart unterworfen...', daß '...jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen flüssigen Fraktionen m,

¹was sicherlich einem zweiten Trennverfahren gleichkommt!

in einem darauf folgenden Trennschritt m_2 flüssige Fraktionen² liefert, wobei nach n Trennschritten $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$ flüssige Fraktionen vorliegen¹.

2.2 Außerdem werden die daraus resultierenden flüssigen Fraktionen mittels UV-Spektroskopie quantitativ bestimmt und die darin enthaltenden Proteine mittels MALDI-TOF/MS, ESI/MS oder Sequenzierung nach dem Edman'schen Verfahren identifiziert, so daß '...nach Zusammenfügen der Analysedaten ein n-dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im n-dimensionalen Datenraum, gewonnen wird'.

2.3 Daraus folgt, daß der Gegenstand des Hauptanspruchs gegenüber diesem Stand der Technik nicht neu ist. Der Hauptanspruch verstößt somit gegen **Artikel 33(2) PCT**.

3. Darüber hinaus beruht der Gegenstand des Hauptanspruchs nicht auf einer nach **Artikel 33(3) PCT** erforderlichen erfinderischen Tätigkeit:

3.1 Das von dem Anmelder entwickelte Verfahren unterscheidet sich von dem aus **D1** bekannten Stand der Technik im wesentlichen dadurch, daß die Proteine mindestens nach einer dritten Eigenschaft, d.h. in einer dritten Dimension, getrennt werden. Durch die Ergreifung dieser Maßnahme wird dem schon in **D1** anerkannten Problem des mangelnden Auflösungsvermögens³ Rechnung getragen. Auf diese Weise wird die der Anmeldung zugrunde gelegte Aufgabe gelöst, '...die Quantifikation und Identifikation der Proteine eines Proteoms zu verbessern, zu erleichtern und für bestimmte Proteine überhaupt zu ermöglichen' (vgl. vorliegende Anmeldung, Seite 9, Absatz 3).

3.2 Auf dem Gebiet der Chromatographie ist es jedoch gang und gäbe, daß eine Verbesserung des Auflösungsvermögens durch die Einführung von weiteren Trenndimensionen zu erzielen ist. Insbesondere wird genau diese Maßnahme bei der aus **D2** bekannten Vorrichtung zur Trennung von Peptiden ergriffen, um

²Der Fall $m_2=1$ fällt auch unter den gültigen Wortlaut des Anspruchs!

³d.h. Peak capacity auf englisch.

das Auflösungsvermögen der Vorrichtung zu erhöhen (vgl. D2, 'Conclusions'; Abbildungen). Darüber hinaus sind die Trennverfahren der ersten bzw. zweiten Dimension in **D1** und **D2** die gleichen. Daher würde der Fachmann sofort auf die Idee kommen, das dritte Trennverfahren des Dokuments **D2** auch bei dem aus **D1** bekannten Verfahren einzusetzen, um das gestellte Problem zu lösen. Auf diese Weise würde er ohne erfinderisches Zutun zum Schutzgegenstand des Anmelders gelangen.

- 3.3 Der Hauptanspruch verstößt somit gegen **Artikel 33(3) PCT**.
4. Weiterhin stellen die weiteren Merkmale der von dem Hauptanspruch abhängigen Ansprüche 2-12 keine Basis für einen neuen und erfinderischen Gegenstand dar, weil sie schon zum Stand der Technik gehören oder nur als fachübliche Alternativen zu den darin ergriffenen Maßnahmen zu betrachten sind:
 - 4.1 Zum Beispiel lassen sich die in **D1** bzw. **D2** verwendeten Trennverfahren unter den in Anspruch 2 angegebenen Verfahren einordnen. Trennung nach Ladung bzw. Form bzw. Affinität der Proteine sind weitere auf diesem Gebiet geläufigen Trennverfahren. Ähnlicherweise ist die in **D1** verwendete Sequenzierung nach dem Edman'schen Verfahren ein Beispiel der in Anspruch 3 beanspruchten Identifikationsverfahren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie ist aus **D1** bekannt (vgl. Anspruch 4). Die Identifikation einzelner Proteine des Proteoms erfolgt in **D1** direkt über die Massebestimmung der Proteine (vgl. Anspruch 5). Die zusätzlichen Merkmale des Anspruchs 6 sind ebenfalls aus **D1** zu entnehmen. Das gleiche gilt für die Verwendung von zweidimensionalen Mehrfachgefäßsystemen, insbesondere Mikrotitrationsplatten, zur Sammlung der flüssigen Fraktionen (vgl. Anspruch 7 bzw 8). Es wäre naheliegend, auch einen Fraktionensammler nach dem ersten Trennverfahren einzusetzen, wenn die Zwischenfraktionen zugänglich sein sollten. Die zusätzlichen Merkmale des Anspruchs 9 wurden schon im Dokument D1 offenbart. Anspruch 10 betrifft fachübliche Maßnahmen zur Ausführung des in Anspruch 9 angegebenen Verfahrens. Das aus **D1** bekannte Verfahren fällt in den Umfang des Anspruchs 11. Es wäre naheliegend, die Analysedaten in einer Datenbank zusammenzufassen.

4.2 Folglich kommt der Ergreifung dieser Maßnahmen keine erfinderische Bedeutung zu.

Abschnitt VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

1. Der Schutzmfang des Hauptanspruchs schließt jedes Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms mit $n > 2$ ein. In der Beschreibung wird jedoch nur ein einziges Ausführungsbeispiel erläutert, und zwar für den Fall $n=3$. Es gibt keinerlei Hinweis, wie die Lehre der Erfindung über den ganzen Schutzmfang zu verwirklichen ist. Folglich wird der Hauptanspruch in vollem Umfang durch die Beschreibung nicht gestützt. Der Hauptanspruch verstößt somit **Artikel 6 PCT**.
